

# **CONSTRUCCIÓ D'UN MODEL METABÒLIC GENÈRIC D'UN MICROORGANSIME ACETOGÈNIC DEL GÈNERE CLOSTRIDIUM**

---

Estudiant: Mireia Raventós Resina

Grau en Biologia

Correu electrònic: mireiaraventos@gmail.com

Tutor: Dr. Jesús Colprim

Empresa/ Institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor:

Nom del tutor: Jesús Colprim Galceran

Empresa / institució: LEQUIA, UdG

Correu(s) electrònic (s): [jesus.colprim@udg.edu](mailto:jesus.colprim@udg.edu)

## Índex

Resum.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
1. Introducció.....	5
1.1. La bioquímica i el perfil energètic de la ruta W-L	
1.2. Perspectiva termodinàmica	
1.3. <i>Clostridium ljungdahlii</i>	
1.4. <i>Clostridium kluyveri</i>	
1.5. Assumpcions del model: l'equilibri químic	
2. Objectives.....	9
3. Metodologia.....	9
4. Resultats.....	12
4.1. Rutes metabòliques	
4.2. Energies lliures de reacció i constants d'equilibri	
4.3. MATLAB - Simbiology	
4.3.1. Paràmetres del model	
5. Discussió.....	21
6. Conclusions.....	23
7. Agraïments.....	24
8. Bibliografia.....	24

## **RESUM**

De tots els mecanismes que existeixen per la fixació del diòxid de carboni en els éssers vius, només la via reductiva Wood-Ljungdahl (WLP), utilitzada pels bacteris acetogènics, compleix amb els dos requisits bàsics per la vida: la conservació d'energia i la producció de biomassa. En aquest projecte, es presenta un prototip de model que permetrà desenvolupar una metodologia per a la modelització de sistemes de cultiu en un bioreactor simulat. Per il·lustrar aquesta metodologia, es desenvolupa un model metabòlic genèric d'estat estacionari per tal de fer prediccions en funció de les condicions ambientals. A més, s'estudien els mecanismes biològics dels bacteris models (*Clostridium ljungdahlii* i *Clostridium kluyveri*) que demostren que ambdós bacteris disposen d'un complex Rnf responsable de la translocació de protons a través de la membrana, fet que els permet conservar l'energia.

La via reductiva del CO<sub>2</sub> condueix a la formació de productes químics de gran densitat energètica com l'acetat, l'etanol i el butirat. Les reaccions metabòliques en aquest treball tenen lloc en punts molt propers a l'equilibri termodinàmic, fet que permet l'acceptació de diferents suposicions. Així doncs, l'objectiu d'aquest treball es basa en la construcció d'un model metabòlic genèric de dos organismes models (*C. ljungdahlii* i *C. kluyveri*) que descriu l'activació de diferents vies metabòliques en funció de les condicions ambientals de la cèl·lula. Els resultats suggereixen que: (i) cap de les reaccions que intervenen en el flux de carboni és directament responsable de la conservació de l'energia, raó per la qual cal un sistema complementari –el complex Rnf– que uneix la transferència electrònica a partir de ferredoxina reduïda (Fd<sup>-2</sup>) al NAD<sup>+</sup>, duent a terme una translocació de protons a través de membrana (aquest mateix gradient de H<sup>+</sup> és utilitzat per una ATPasa per generar ATP); (ii) l'únic punt metabòlic que permet la conservació de l'energia és el complex Rnf; (iii) la quantitat total d'energia obtinguda en la ruta WL en forma d'ATP varia segons els enzims implicats proposats; (iv) *C. ljungdahlii* i *C. kluyveri* són considerats com a organismes interessants per ser utilitzats com a plataforma de producció microbiana; (v) hi ha certs paràmetres que afecten directament les vies metabòliques i els resultats del model.

Així doncs, els bacteris acetogènics són organismes de gran interès d'estudi ja que es podrien utilitzar com a biocatalitzadors en la indústria biotecnològica, gràcies a la seva capacitat de fermentació de gasos com el CO<sub>2</sub>.

## **RESUMEN**

De todos los mecanismos que existen para la fijación del dióxido de carbono en los seres vivos, sólo la vía reductiva Wood-Ljungdahl (WLP), utilizada por las bacterias acetogénicas, cumple con los dos requisitos básicos para la vida: la conservación de energía y la producción de biomasa. En este proyecto, se presenta un prototipo de modelo que permitirá desarrollar una metodología para la modelización de sistemas de cultivo en un bioreactor simulado. Para ilustrar esta metodología, se desarrolla un modelo metabólico genérico de estado estacionario que permita hacer predicciones en función de las condiciones ambientales. Además, se hace un estudio biológico de las bacterias modelo (*Clostridium ljungdahlii* y *Clostridium kluyveri*) que demuestran que ambas bacterias disponen de un complejo Rnf responsable de la translocación de protones a través de la membrana que les permite conservar la energía.

La vía reductiva del CO<sub>2</sub> conduce a la formación de productos químicos de gran densidad energética como el acetato, el etanol y el butirato. Las reacciones metabólicas en este trabajo tienen lugar en puntos muy cercanos al equilibrio termodinámico, lo que permite la aceptación de diferentes suposiciones. Así pues, el objetivo de este trabajo se basa en la construcción de un modelo metabólico genérico de dos organismos modelos (*C. ljungdahlii* y *C. kluyveri*) que describa la activación de diferentes vías metabólicas en función de las condiciones ambientales de la célula. Los resultados sugieren que: (i) ninguna de las reacciones que intervienen en el flujo del carbono es directamente responsable de la conservación de energía, razón por la que disponen de un sistema complementario –el complejo Rnf– que une la transferencia electrónica a partir de ferredoxina reducida (Fd<sup>2-</sup>) al NAD<sup>+</sup> llevando a cabo una translocación de protones a través de membrana (ese mismo gradiente de H<sup>+</sup> es utilizado por una ATPasa para generar ATP); (ii) el único punto metabólico que permite la conservación de la energía es el complejo RNF; (iii) la cantidad total de energía obtenida en la ruta WL en forma de ATP varía según las enzimas implicadas propuestos; (iv) *C.ljungdahlii* y *C.kluyveri* son considerados como organismos interesantes para ser utilizados como plataforma de producción microbiana; (v) Hay ciertos parámetros que afectan directamente a las vías metabólicas y los resultados del modelo.

Así pues, las bacterias acetogénicas son organismos de gran interés de estudio ya que se podrían utilizar como biocatalizadores en la industria biotecnológica, gracias a su capacidad de fermentación de gases como el CO<sub>2</sub>.

**ABSTRACT**

Of all the existing mechanisms for the carbon dioxide fixation in the living beings, only the Wood-Ljungdahl (WLP) reductive pathway, used by acetogenic bacteria, sustains the two basic requirements for life: conservation of energy and the production of biomass. In this project, a prototype model is presented allowing the development of a methodology for the modeling of culture systems in a simulated bioreactor. To illustrate this methodology, a generic metabolic model of stationary state is developed in order to make predictions based on the environmental conditions. In addition, a biological study of the model bacteria (*Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri*) is performed to demonstrate that both bacteria have a Rnf complex responsible for the translocation of protons through the membrane that allows them to conserve energy.

The reductive pathway of CO<sub>2</sub> leads to the formation of high energy density chemicals such as acetate, ethanol and butyrate. Metabolic reactions in this work take place at points very close to the thermodynamic equilibrium, which allows the acceptance of different assumptions. Therefore, the purpose of this work is based on the construction of a generic metabolic model of two model organisms (*C. ljungdahlii* and *C. kluyveri*) that describes the activation of different metabolic pathways depending on the environmental conditions of the cell. The results suggest that: (i) none of the reactions that take part in the carbon flow are directly responsible for the conservation of energy, which is why a complementary system –the Rnf complex– that connects the electronic transfer from reduced ferredoxin (Fd-2) to NAD<sup>+</sup>, is executed by carrying out a translocation of protons through the membrane (this same gradient of H<sup>+</sup> is used by an ATPase to generate ATP); (ii) the only metabolic point that allows the conservation of energy is the Rnf complex; (iii) the total amount of energy obtained in the WL route in the form of ATP varies according to the involved enzymes proposed; (iv) *C. ljungdahlii* and *C. kluyveri* are considered as interesting organisms to be used as a microbial production platform; (v) there are certain parameters that directly affect the metabolic pathways and the results of the model.

Therefore, acetogenic bacteria are organisms of great study interest as they could be used as biocatalysts in the biotechnology industry, thanks to their capacity for fermentation of gases alike CO<sub>2</sub>.

## 1. Introducció

Una de les qüestions termodinàmiques més difícils de resoldre es basa en un grup reduït de microorganismes anomenats acetògens, els quals poden dur a terme una conversió anaeròbica de la matèria orgànica en productes altament energètics, fet que els atorga una gran importància biotecnològica.

Els acetògens són un grup d'organismes autòtrofs molt divers que formen acetat com a principal producte de la respiració anaeròbica, procés conegut com a acetogènesi. Algunes espècies poden sintetitzar autotràficament acetat a partir de diverses fonts d'energia (com per exemple l'hidrogen) i diverses fonts de carboni (com el diòxid de carboni), procés que es duu a terme al mitocondri. Tanmateix, són capaços de dur a terme la respiració anaeròbica simultàniament amb la fixació del carboni mitjançant la reducció de l'Acetil-CoA per la via anomenada Wood-Ljungdahl (WLP). Els acetògens també són coneguts com a homoacetògens ja que poden produir Acetil-CoA a partir de dues molècules de  $\text{CO}_2$  i quatre d' $\text{H}_2$ , que s'acaben reduint per obtenir alcohols com l'acetat, l'etanol o el butirat.

Aquest tipus de microorganismes es troben presents en 23 gèneres diferents de bacteris, fet que indica que l'acetogènesi no és una característica filogenètica pròpia d'un únic grup d'organismes. A més, són organismes que poden viure en una gran varietat d'hàbitats i, per aquest motiu, són d'un gran interès, ja que poden utilitzar diferents compostos com a font d'energia. Així doncs, és interessant estudiar el funcionament metabòlic d'aquests tipus de microorganismes (com *C.ljungdahlii* i *C.kluyveri*) ja que la via Wood-Ljungdahl és l'únic procés per la fixació del  $\text{CO}_2$  que sustenta els dos requeriments vitals per la vida: la conservació de l'energia i la producció de biomassa.

La via Wood-Ljungdahl (WLP) porta el nom dels seus descobridors: Harland G.Wood i Lars. G. Ljungdahl. Consta de la reducció de dues molècules de  $\text{CO}_2$  que són ajuntades per formar Acetil-CoA i posteriorment acetat. A més, la via WLP és l'única via de fixació del  $\text{CO}_2$  que es troba lligada a la conservació d'energia i es considera una de les rutes més antigues que permet la producció de biomassa i ATP <sup>IX</sup>.

Per tal de poder realitzar un model metabòlic dels biomecanismes que utilitzen els dos microorganismes estudiats en aquest projecte, *C.ljungdahlii* i *C.kluyveri*, s'aprofundiran en conceptes com els mecanismes de conservació de l'energia, i es fa una recerca des de la perspectiva biològica que permeti explicar la seva supervivència, mitjançant una reacció global amb un canvi d'energia lliure que genera en total menys d'una molècula d'ATP.

### 1.1. La bioquímica i el perfil energètic de la ruta W-L

En tota la ruta els diferents acceptors d'electrons ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  i les ferredoxines) juguen un paper vital en el sosteniment de la vida dels microorganismes, ja que permeten dur a terme la regeneració dels metabòlits entremetjats.

La ruta W-L està formada per dues vies diferenciades: la via del carbonil i la via del metil (veure Figura 1). Per una banda, el  $\text{CO}_2$  és reduït a CO en la branca carbonil, i per l'altre, a un grup metil en la via del metil. La primera reacció de reducció en la via del metil produeix format ( $\text{CO}_2 \rightarrow \text{Format}$ ). Consegüentment, el grup formil s'uneix a una molècula de tetrahidrofolat (THF) formant el formil-THF, una reacció que requereix la hidròlisi d'una molècula d'ATP. Consegüentment, s'allibera una molècula d'aigua al medi en la reacció d'obtenció del metenil-THF, la qual és reduïda en el següent pas a metilè-THF. Aquesta reacció pot utilitzar el NADPH o el NADH com a reductants. A continuació el metilè-THF és reduït a metil-THF sent una de les reaccions de la ruta amb el potencial redox més positiu ( $E_0' = -200 \text{ mV}$  a  $-13 \text{ mV}$ )<sup>VII</sup>. Finalment, el grup metil és transferit, mitjançant metiltransferases i una proteïna corrinòide de ferro-sofre, a una subunitat de la CO deshidrogenasa/Acetil-CoA sintasa (CODH/ACS)<sup>I-II</sup>.

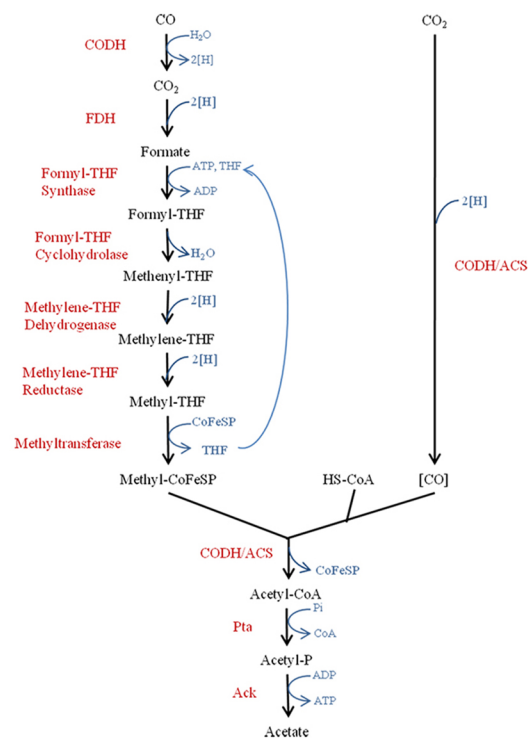


Figura 1. Ruta metabòlica Wood-Ljungdahl

Pel que fa a la via del carbonil, el grup carbonil de l'acetat prové d'una segona molècula de  $\text{CO}_2$  la qual es redueix a CO per l'enzim CODH/ACS. Aquest mateix enzim catalitza la síntesi de l'Acetil-CoA a partir del grup metil, el carbonil i el CoA. Finalment, l'Acetil-CoA es converteix en acetat per mitjà de fosfotransacetilases i l'acetat quinasa. D'aquesta manera, el CoA es recicla i adopta exclusivament una funció catalítica. En conseqüència, el total de molècules d'ATP sintetitzades en les reaccions de fosforilació a nivell de substrat és 0, ja que es sintetitza 1 molècula d'ATP durant la reacció de l'acetat quinasa, però aquesta es gasta posteriorment amb l'activació del format. És per aquest motiu que els bacteris acetogènics necessiten d'un sistema quimiosmòtic, com la translocació de protons a través de membrana, per tal de poder conservar l'energia.

### 1.2. Perspectiva termodinàmica

La reducció total de dues molècules de  $\text{CO}_2$  per tal d'obtenir acetat amb l'hidrogen com a donador d'electrons resulta en una reacció exergònica, és a dir, que allibera energia. Segons les condicions calculades per Schuchmann and Müller, 2014<sup>III</sup> el total de l'energia lliure alliberada, utilitzant unes

condicions fisiològiques molt semblants a les utilitzades en aquest projecte (25°C i pH 7.0), és aproximadament  $\Delta G' = -40$  kJ per mol. Cal destacar, però que l'energia lliure alliberada s'ha calculat a partir de la suma de totes les reaccions intermèdies de la ruta, i això implica que algunes poden ser més exergòniques que d'altres i, fins i tot, algunes poden arribar a ser endergòniques. De fet, la barrera termodinàmica més gran que existeix en la ruta WL es torba en la reducció del  $\text{CO}_2$  a CO, en la branca del carboni, amb un potencial de reducció d'uns  $E'_0 = -520$  mV <sup>IV</sup>.

En la ruta WL participen diferents parelles de portadors d'electrons com el NADH/NAD<sup>+</sup>, el NADPH/NADP<sup>+</sup> i les ferredoxines. Aquestes últimes són les úniques capaces de proveir electrons per la reacció del  $\text{CO}_2$  a CO. En condicions fisiològiques poden arribar a tenir potencials de reducció menors a -500mV <sup>V</sup>, ja que presenten un potencial redox estàndard ( $E'_0$ ) molt més negatiu que la parella NAD<sup>+</sup>/NADH, utilitzada en la majoria dels microorganismes. Malgrat tot, un dels principals problemes metabòlics que presenten la majoria dels microorganismes no acetogènics és el flux d'electrons des de l'hidrogen a les ferredoxines. No obstant, els organismes acetogènics resolen aquest problema amb l'ús de les flavines, que són cofactors capaços de bifurcar electrons a les ferredoxines durant el transport d'electrons. Així doncs, el grup de les flavines es utilitza com a cofactor en nombroses reaccions d'oxidació-reducció. En aquest cas concret, la reducció de les ferredoxines es realitza amb l'addició d'àtoms d'hidrogen a àtoms de nitrogen específics en un sistema propi de les flavines anomenat anell d'isoalloxazina <sup>VI</sup>.

A tall de recapitulació, cap de les reaccions involucrades en el flux del carboni en la via Wood-Ljungdahl és directament responsable de la conservació d'energia. És per aquest motiu que és imprescindible una quimiosmosi que es trobi estretament relacionada amb les reaccions de la WL. Així doncs, aquest fet és possible gràcies a l'acumulació de ferredoxina reduïda, la qual posteriorment serà oxidada pels complexos de membrana -com l'Rnf- els quals generaran un gradient quimiosmòtic. El complex Rnf al ser un dispositiu multifuncional, també permet dur a terme la translocació de protons a través de la membrana i d'aquesta manera conservar l'energia durant l'acetogènesi. <sup>XXI</sup>.

### 1.3. *Clostridium ljungdahlii*

Taxonomia: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Clostridia*; *Clostridiales*; *Clostridiaceae*; *Clostridium*

*C. ljungdahlii* és un dels microorganismes utilitzats en aquest projecte. És un gram-positiu formador d'espores mòbil que creix en  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , CO, format, etanol, piruvat, fumarat i sucres <sup>X</sup>. A diferència d'altres organismes com *Acetobacterium woodii*, ni els citocroms ni els ions de sodi estan implicats en la generació d'energia. En comptes, disposen d'un complex Rnf que els hi permet dur a terme la translocació de protons i d'aquesta manera, generar energia per mitjà d'un gradient transmembrana <sup>XI</sup>.

El genoma de *C. ljungdahlii* codifica per una transhidrogenasa positiva que utilitza per tal de bifurcar els electrons anomenada Rnf <sup>XII</sup> i es troba codificada per Clju\_c37240 <sup>XIII</sup>. També disposa d'un complex d'enzims hidrogenases i format dehidrogenases que són responsables de la reducció de les



ferredoxines, el NAD<sup>+</sup> i/o el NADP<sup>+</sup>. Malgrat tot, avui en dia encara es desconeix gran part del funcionament d'aquest mecanisme que utilitzen per reduir l'hidrogen.

#### 1.4. *Clostridium kluyveri*

Taxonomia: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Clostridia*; *Clostridiales*; *Clostridiaceae*; *Clostridium*

*Clostridium kluyveri* és un organisme d'especial d'interès d'estudi en el gènere *Clostridium*, i és utilitzat també com a organisme model d'aquest projecte. Pot créixer en condicions anaeròbiques utilitzant l'etanol i/o l'acetat com a font d'energia, i generar productes com l'H<sub>2</sub>, el butirat i el caproat<sup>XIV-XV</sup> i alhora pot realitzar el procés contrari i generar acetat a partir del H<sub>2</sub>.

També disposa d'una sistema molt semblant a *C. ljungdahlii* anomenat complex RnfA-E que s'encarrega de generar el gradient transmembrana i una ATP sintasa (AtpA-I) ancorada a la membrana citoplasmàtica que permet obtenir ATP i per tant, conservar l'energia.

#### 1.5. Assumpcions del model: l'equilibri químic

El model desenvolupat suposa un organisme virtual capaç de catalitzar la ruta WL a partir del CO<sub>2</sub> i una posterior reducció de l'acetat que condueix a la producció de productes com l'acetat, l'etanol, el butirat i biomassa (ATP). A més, també es considera el transport de productes a través de la membrana citoplasmàtica, com és el cas de les formes protonades dels alcohols i el transport de protons.

Un sistema en estat estacionari, és aquell el qual totes les seves reaccions es mantenen constants al llarg del temps. Això significa que la seva derivada respecte el temps és igual a 0. D'aquesta manera es pot assumir que les bioreaccions en aquest model es troben en punts molt propers l'equilibri termodinàmic<sup>XVIII</sup>. Aquesta assumpció permet justificar que en condicions d'equilibri el comportament del microorganisme virtual és similar al d'un acetògen real.

Altrament, des del punt de vista termodinàmic, s'ha de considerar que l'energia lliure Gibbs total ha de ser negativa, és a dir, exergònica, per tal de permetre un flux positiu cap a la formació de productes. Les activitats dels substrats i productes afecten a l'energia lliure de Gibbs de cada reacció (veure equació 1 i 2), i això implica que l'acumulació de productes pot arribar a provocar una limitació termodinàmica en el sistema. És per aquest motiu que el model proposat es basa en el supòsit que els productes obtinguts seran els que proporcionin la màxima generació d'energia per als processos de creixement en les condicions establertes en el medi.

$$\boxed{aA + bB \rightleftharpoons cC + dD}$$

$$K_{eq} = \frac{C^c \cdot D^d}{A^a \cdot B^b} \quad (1)$$

$$\boxed{\Delta G_R^0 = -R \cdot T \cdot \ln(K_{eq})} \quad (2)$$

## 2. Objective

The main objective of this work is based on a theoretical construction of a metabolic model that describes the activation of different metabolic pathways depending on the environmental conditions of the cell. The aim is to focus in a very particular case, the *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* microorganisms. Also the Wood Ljungdhal pathway and the formation of acetate, ethanol and butyrate from Acetyl-CoA will be studied.

By imposing changes in the parameters that compose the model and the process conditions, it would be possible to investigate the potential reversibility of specific anaerobic pathways of interest.

## 3. Metodologia

Aquest apartat presenta un enfocament general de la construcció i resolució del model. Per dur a terme la metodologia, s'ha desenvolupat un model metabòlic que permet fer prediccions en un estat dinàmic per mitjà del programa informàtic MATLAB®- Simbiology.

En primer lloc, s'ha realitzat un recull de totes les reaccions que es donen a terme en el procés complet. Les rutes estan separades en tres mòduls, segons el tipus de funció: la via Wood-Ljungdahl, producció d'alcohols (com l'acetat, l'etanol i el butirat) i la regeneració de metabòlits. Per tal de treballar amb el mateix criteri, totes les rutes s'obtenen de la base de dades del *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)*. Tanmateix, s'estableix una única direcció general encarada a la formació de productes com l'acetat, l'etanol i/o el butirat. Segons la direcció en com han estat descrites al KEGG, s'anoten com a 1 si la reacció segueix la direcció establerta, és a dir, cap a productes; o, per contra, s'anota com a -1 si la direcció descrita és a la inversa. A més, de cada reacció es recull el seu número d'identificador del KEGG i el nom i número d'identificació de l'enzim que catalitza cada reacció. Així com també es recullen tots els compostos de cada reacció i si actuen de substrats se'ls numera com a 1 i, mentre que si ho fan com a productes, com a -1. Cal destacar que els compostos de les reaccions es valoren segons com es troben descrits al KEGG, indiferentment de la direcció que segueixin.

Un cop s'han descrit totes les reaccions, es fa una recerca bibliogràfica de cada una de les energies de formació lliure de Gibbs ( $\Delta_f G^\circ$ ) en la base de dades de MetaCyc<sup>XVI</sup>. Totes les energies han estat calculades a pH 7,3 i una força iònica de 0,25. En aquest projecte, s'ha utilitzat pH 7,3 perquè el càlcul de l'estat de protonació de gran part dels compostos de MetaCyc utilitza aquest valor<sup>XVI-XVII</sup>. A continuació, es calcula l'energia lliure de cada reacció ( $\Delta G^\circ_r$ ) a partir de la suma-producte de tots els components que formen cada reacció (segons si són substrat o producte, 1 i -1 respectivament) i multiplicat tot per la direcció general de la reacció (1 o -1 segons si al KEGG es troba descrita directa o inversament). D'aquesta manera, a partir de l'energia lliure de la reacció, es pot calcular la constant d'equilibri ( $K_{eq}$ ) de cada reacció (veure equacions 3 i 4).

$$\Delta G_R^0 = -R \cdot T \cdot \ln(K_{eq}) \quad (3)$$

$$\begin{array}{l} R, \text{ constant de gasos: } 8,31446 \text{ J} \\ T, \text{ temperatura: } 298K \end{array} \quad (4)$$

Per tal de poder donar una solució al model, cal donar un valor acordat a una de les components ( $K_f$  i  $K_r$ ) de la equació de la velocitat de reacció per tal de donar a la constant d'equilibri de cada reacció un valor. D'aquesta manera, s'assumeix que la constant *reverse* ( $K_r$ ) és igual a 1, i la constant *forward* ( $K_f$ ) resulta ser la  $K_{eq}$  (veure equacions 5 i 6).

$$\begin{array}{c} aA + bB \rightleftharpoons cC + dD \\ K_{eq} = \frac{C^c \cdot D^d}{A^a \cdot B^b} \end{array} \quad (5)$$

$$K_{eq} = \frac{K_f}{K_r} \quad (6)$$

$$\text{Si } K_r = 1, K_f = K_{eq}$$

Consegüentment, es pot donar una solució estimada a la velocitat de les reaccions per mitjà de l'assumpció de les constants *reverse* i *forward*. Això implica que totes les reaccions es consideren a la mateixa velocitat. Malgrat tot, quan s'arribi a un estat estacionari, el repartiment entre reactius i productes serà el que indiqui l'equilibri. Aquesta assumpció, permet veure l'estat estacionari però no l'evolució dinàmica amb el temps. És per aquest motiu, que s'utilitza el programari Matlab®-Simbiology per generar una simulació dinàmica únicament en els punts finals del equilibri. I aquests s'utilitzaran com a punts representatius de l'estat del model.

Un cop recollides totes les reaccions amb els seus compostos i energies, es duu a terme la part computacional. Mitjançant l'extensió Simbiology del programa informàtic Matlab®, s'introdueixen els paràmetres, variables, reaccions i concentracions establertes per tal de simular el model. Per tal de simplificar la resolució del model, s'utilitza un medi soluble amb unes condicions establertes que s'adeqüen als requeriments de l'estudi. En aquest cas, s'utilitza un bioreactor teòric on se li introdueix al medi  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2$ , com a donadors de carboni i poder reductor, respectivament. Així doncs, mitjançant la utilització d'aquest programari és possible fer una predicció de la formació de productes a partir del  $\text{H}_2$ , i el  $\text{CO}_2$ , la pressió parcial dels gasos ( $\text{H}_2$ ), el pH del reactor i la cèl·lula, la concentració dels substrats i els metabòlits entremetjats.

En referència a les components del model, aquest està format per:

- Variables d'estat: defineixen el concepte de balanç de matèria que existeix en el model, i tenen unitats de massa/temps. Aquest concepte fa referència a que cada una de les reaccions es troben involucrades en l'entrada, sortida i acumulació de metabòlits amb la generació i el consum d'energia dins del medi i/o la cèl·lula (veure equació 7). Cada variable d'estat es troba definida per una equació diferencial anomenada ODE (*Ordinary Differential Equations*), que en conjunt, formen un sistema d'equacions diferencials. Destacar que existeixen tantes equacions diferencials com a variables d'estat forma el model.

$$\text{Balanç de matèria} \rightarrow \text{Entada de metabòlits} - \text{sortida de metabòlits} + \text{generació de metabòlits} = \text{Acumulació de massa} \quad (7)$$

- Reaccions: fa referència a totes les rutes metabòliques que formen el model. Dins de les reaccions apareixen tots els paràmetres del model, i es diferencien segons la seva finalitat: reaccions de regeneració, d'obtenció de poder reductor i equacions químiques (protonació i desprotonació). D'aquestes últimes només es consideren les de l'acetat i el butirat, ja que sense la forma protonada no poden travessar la membrana, en canvi, l'etanol al tenir mides més petites pot travessar la membrana sense haver de protonar-se<sup>xxii</sup>. També es consideren les reaccions de transport a través de la membrana com ara el flux de protons, l'acetat i el butirat.
- Transport de metabòlits: fa referència als fluxos d'entrada i sortida que existeix entre els dos ambients principals del sistema, la cèl·lula i el medi del bioreactor. Existeixen dos tipus de transport a través de la membrana. Per una banda, el transport per difusió, dut a terme pel CO<sub>2</sub>, l'àcid acètic, l'etanol i l'àcid butíric. Cal assenyalar, que pel que fa als alcohols, només les formes protonades són les úniques capaces de traspasar la membrana per gradient de concentració<sup>xix, xx</sup>.

Així doncs, cal introduir al model les equacions de desprotonació i protonació, ja que es suposa que les formes no dissociades dels productes i substrats es poden difondre lliurement per la membrana cel·lular sense considerar cap canvi d'energia. La velocitat de la reacció de cada àcid es troba descrita per la seva pròpia constant de dissociació àcida (pKa)<sup>xxiii</sup> (veure equacions 8 i 9). A major pH extracel·lular, es possible obtenir energia del transport de la forma lliure de l'àcid en el cas que la producció metabòlica superi el flux de difusió lliure dirigit cap a l'exterior. És per aquest motiu que és important que es contemplin les reaccions dels àcids com a reversibles, ja que ha d'existir un flux tant d'entrada com de sortida el qual permeti una estabilització del model en un cert període de temps. D'aquesta manera, l'únic gast de protons és consumit per l'ATPasa unida a la membrana, que translocarà protons al exterior. El transport de H<sup>+</sup> dut a terme per l'ATPasa és irreversible i es troba descrit per dues reaccions diferents, una d'entrada de protons, que genera energia, i una de sortida, que en gasta.

$$\begin{array}{l}
 A^- + H^+ \rightleftharpoons HA \\
 K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}
 \end{array} \quad (8) \qquad pK_a = -\log_{10} K_a \quad (9)$$

Pel que fa al transport de protons a través de membrana, el model desplaça la entrada i/o la sortida segons el pH. Si el pH a l'interior de la cèl·lula és més àcid que el fisiològic establert (7,2), voldrà dir que hi ha un excés de protons al interior, i per tant, sortiran fora la membrana per mitjà de l'ATPasa, generant ATP. En canvi, si al exterior el pH és menor al fisiològic hi haurà una entrada de protons, procés on intervé el complex Rnf.

D'aquesta manera el software resol el complex sistema d'equacions diferencials (ODEs) igualant-les a 0. I és possible donar una solució al model en l'estat dinàmic un cop s'arribi a una estabilització dels productes (calculats en l'equilibri) al cap d'un cert període de temps.

- Altres paràmetres. També s'hi torben definits diversos paràmetres com el pH, la relació volum cèl·lula i medi i les pressions parcials d'H<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>. Tot aquest conjunt formen els paràmetres del model, i són constants que se'ls hi dóna un valor per tal de poder resoldre el sistema.

Finalment, es fa una recerca des del punt de vista biològic dels mecanismes que disposen els organismes *C.ljungdahlii* i *C.kluyveri* per dur a terme la regeneració i obtenció del poder reductor i el transport de protons a través de membrana. És a dir, quines són les estratègies que utilitzen que permeten explicar la seva supervivència mitjançant l'ús d'una reacció global que permet el creixement bacterià.

#### 4. Resultats

Els resultats obtinguts de la metodologia es troben recollits en els següents apartats:

##### 4.1. Rutes metabòliques

Les diferents reaccions metabòliques es torben recollides en tres mòduls diferents:

- **Via Wood-Ljungdahl.** En la taula 1 i 2 es troben recollides totes les rutes metabòliques que formen part de la via WL i les seves informacions enzimàtiques. Aquest mòdul s'ha extret del Carbon Fixation Pathway in Prokaryotes (rn00720) de la base de dades del KEGG.

*Taula 1. Recull de les descripcions del KEGG de les rutes de la via Wood-Ljungdahl i les seves respectives direccions.*

Identificador KEGG	Ruta	Direcció descrita al KEGG
R00134	Formate + NADP+ <=> CO2 + NADPH + H+	-1
R00943	Tetrahydrofolate + Formate + ATP <=> ADP + Pi + 10-Formyltetrahydrofolate	1
R01655	5,10-Methenyltetrahydrofolate + H2O <=> 10-Formyltetrahydrofolate + H+	-1
R01220	5,10-Methylenetetrahydrofolate + NADP+ <=> 5,10-Methenyltetrahydrofolate + NADPH	-1
R07168	5-Methyltetrahydrofolate + NAD+ <=> 5,10-Methylenetetrahydrofolate + NADH + H+	-1
R02289	5-Methyltetrahydrofolate + Co(I) corrinoid protein + H+ <=> Methyl-Co(III) corrinoid protein + Tetrahydrofolate	1
R08433	Acetyl-CoA + Co(I) corrinoid protein + H+ <=> CO + Methyl-Co(III) corrinoid protein + CoA	-1
R10243	Tetrahydrofolate + Acetyl-CoA <=> 5-Methyltetrahydrofolate + CoA	-1

	+ CO	
R07157	CO + H <sub>2</sub> O + Oxidized ferredoxin $\rightleftharpoons$ CO <sub>2</sub> + Reduced ferredoxin	-1

Taula 2. Recull de les descripcions de la nomenclatura enzimàtica i el número d'identificador descrit en el KEGG de la via Wood-Ljungdahl.

Identificador KEGG Enzim	Nomenclatura enzimàtica KEGG
1.17.1.10	formate dehydrogenase (NADP+)
1.2.7.4	anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase
1.5.1.20	methylenetetrahydrofolate reductase
1.5.1.5	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+)
2.1.1.245	5-methyltetrahydrosarcinapterin:corrinoid/iron-sulfur protein Co-methyltransferase
2.1.1.258	5-methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein Co-methyltransferase
2.3.1.169	CO-methylating acetyl-CoA synthase
3.5.4.9	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
6.3.4.3	formate-tetrahydrofolate ligase

- **Producció d'alcohols.** En aquest mòdul, trobem tres vies principals:
  - a) Formació d'acetat. En la taula 3 i 4 es troben recollides les reaccions a partir del Acetil-CoA fins a acetat, juntament amb les seves respectives informacions enzimàtiques. Aquest mòdul s'ha extret del Carbon Fixation Pathway in Prokaryotes (rn00720) de la base de dades del KEGG.

Taula 3. Recull de les descripcions del KEGG de les rutes de la via de formació del acetat i les seves respectives direccions.

Identificador KEGG	Ruta	Direcció descrita al KEGG
R00230	Acetyl-CoA + Pi $\rightleftharpoons$ CoA + Acetyl phosphate	1
R00315	ATP + Acetate $\rightleftharpoons$ ADP + Acetyl phosphate	-1

Taula 4. Recull de les descripcions de la nomenclatura enzimàtica i el número d'identificador descrit en el KEGG de la via formativa del acetat.

Identificador KEGG Enzim	Nomenclatura enzimàtica KEGG
2.3.1.8	phosphate acetyltransferase
2.7.2.1	acetate kinase

- b) Formació d'etanol. En la taula 5 i 6 es troben recollides les reaccions a partir del Acetil-CoA fins a la formació d'etanol, juntament amb les seves respectives informacions enzimàtiques. Aquest mòdul s'ha extret del Carbon Fixation Pathway in Prokaryotes (rn00720) de la base de dades del KEGG.

*Taula 5. Recull de les descripcions del KEGG de les rutes de la via de formació del etanol i les seves respectives direccions.*

Identificador KEGG	Ruta	Direcció descrita al KEGG
R00228	Acetaldehyde + CoA + NAD+ $\rightleftharpoons$ Acetyl-CoA + NADH + H+	-1
R00746	Ethanol + NADP+ $\rightleftharpoons$ Acetaldehyde + NADPH + H+	-1

*Taula 6. Recull de les descripcions de la nomenclatura enzimàtica i el número d'identificador descrit en el KEGG de la via formativa del etanol.*

Identificador KEGG Enzim	Nomenclatura enzimàtica KEGG
1.2.1.10	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)
1.1.1.2	alcohol dehydrogenase (NADP+)

- c) Formació del butirat. En la taula 7 i 8 es troben recollides les reaccions a partir del Acetil-CoA fins a la formació d'àcid butíric, juntament amb les seves respectives informacions enzimàtiques. Aquest mòdul s'ha extret del metabolisme del àcid butíric (rn00650) de la base de dades del KEGG.

*Taula 7. Recull de les descripció del KEGG de les rutes de la via de formació del butirat, i les seves respectives direccions.*

Identificador KEGG	Ruta	Direcció descrita al KEGG
R00238	2 Acetyl-CoA $\rightleftharpoons$ CoA + Acetoacetyl-CoA	1
R01975	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA + NAD+ $\rightleftharpoons$ Acetoacetyl-CoA + NADH + H+	-1
R05595	Crotonoyl-CoA + H <sub>2</sub> O $\rightleftharpoons$ 3-Hydroxybutanoyl-CoA	-1
R11675	Butanoyl-CoA + 2 NAD+ + 2 Reduced ferredoxin $\rightleftharpoons$ Crotonoyl-CoA + 2 NADH + 2 Oxidized ferredoxin	-1
R01179	Butanoyl-CoA + Acetate $\rightleftharpoons$ Butanoic acid + Acetyl-CoA	1
R00238	2 Acetyl-CoA $\rightleftharpoons$ CoA + Acetoacetyl-CoA	1

*Taula 8. Recull de les descripcions de la nomenclatura enzimàtica i el número d'identificador descrit en el KEGG de la via formativa del butirat.*

Identificador KEGG Enzim	Nomenclatura enzimàtica KEGG
2.3.1.9	acetyl-CoA C-acetyltransferase
1.1.1.35	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; beta-hydroxyacyl dehydrogenase;
4.2.1.17	enoyl-CoA hydratase; enoyl hydratase;
1.3.1.109	butanoyl-CoA dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> , ferredoxin)
2.8.3.8	acetate CoA-transferase

- **Regeneració de metabòlits.**

- a) Obtenció de poder reductor. Trobem dues vies principals d'obtenció de poder reductor. La primera (R09508) (veure taula 9), la qual a partir de l'hidrogen, NAD<sup>+</sup> reduït i una ferredoxina oxidada, s'obtenen protons, NADH oxidat i ferredoxina reduïda.

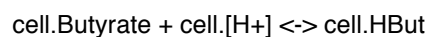
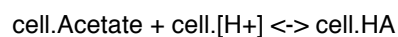
*Taula 9. Recull de les descripcions del KEGG de la ruta d'obtenció de poder reductor a partir del H<sub>2</sub>, amb la seva respectiva direcció i informació enzimàtica.*

Identificador KEGG	Ruta	Direcció descrita al KEGG	Identificador KEGG Enzim	Nomenclatura enzimàtica KEGG
R09508	H <sub>2</sub> + 0.5 NAD <sup>+</sup> + 0.5 Fer <sub>ox</sub> <-> 2 H <sup>+</sup> + 0.5 NADH + 0.5 Fer <sub>red</sub>	1	1.12.1.4	hydrogenase (NAD <sup>+</sup> , ferredoxin)

- b) Regeneració de les ferredoxines. Aquesta reacció no es troba descrita al KEGG però s'utilitza la reacció descrita per Schuchmann and Müller 2014<sup>III</sup>:



- **Equacions químiques.** S'inclouen les equacions de protonació i desprotonació dels àcids per tal de permetre l'intercanvi dels metabòlits entre el medi i la cèl·lula.





## 4.2. Energies lliures de reacció i constants d'equilibri ( $K_{eq}$ )

En aquest apartat es troben recollides les energies lliures de reacció i les constants d'equilibri, calculades a partir de les entalpies de formació dels diferents compostos que formen cada reacció.

*Taula 10. Recull de les energies de reacció i les respectives constants d'equilibri de totes les reaccions que formen el model.*

Reacció	Direcció	$\Delta G^\circ r$	$K_{eq}$	Reacció	Direcció	$\Delta G^\circ r$	$K_{eq}$
R00134	-1	48,381	0,9807	R00746	-1	15,634	0,9937
R00943	1	-106,448	1,0439	R00230	1	-30,418	1,0124
R01220	-1	-38,454	1,0156	R00315	-1	29,170	0,9883
R01655	-1	174,892	0,9318	R00238	1	29,539	0,9881
R02289	1	-69,805	1,0286	R01975	-1	18,862	0,9924
R07157	-1	138,786	0,9455	R05595	-1	9,050	0,9964
R07168	-1	18,737	0,9925	R11675	-1	-154,242	1,0642
R08433	-1	14,116	0,9943	R01179	1	3,138	0,9987
R10243	-1	-55,689	1,0227	R09508	1	-256,066	1,1089
R00228	-1	54,259	0,9783	R_Nfn	1	109,145	0,9569

## 4.3. MATLAB-SIMBIOLOGY (software)

### 4.3.1. Paràmetres i entrades del model

Un cop recollides totes les dades necessàries per generar el model, s'introdueixen al software Matlab®-Simbiology per tal de generar la simulació computacional del model. En la següent taula s'especifiquen totes les espècies, concertacions i les respectives localitzacions, segons si es troben en la cèl·lula o el medi.

*Taula 11. Conjunt total de totes les espècies del model.*

Espècie	Quantitat inicial (mM)	Àmbit	Espècie	Quantitat inicial (mM)	Àmbit
CO <sub>2</sub>	0.00614	cèl·lula/ medi	NADH	0.01	cèl·lula
CO	0.00614	cèl·lula	Proteïna Co (I) corrinoide	0.05	cèl·lula
Format	0.001	cèl·lula	Proteïna Metil-Co(III) corrinoide	0.05	cèl·lula
Tetrahydrofolat (THF)	0.02	cèl·lula	CoA	0.01	cèl·lula
10-formiltetrahydrofolat	0.002	cèl·lula	Aigua	55.0	cèl·lula/ medi
5,10-	0.002	cèl·lula	OH-	1.0E-7	cèl·lula/medi

Meteniltetrahydrofolat					
5,10-Metilètetrahydrofolat	0.002	cèl·lula	H <sub>2</sub>	0.007456	cèl·lula/medi
5-Metiltetrahydrofolat	0.002	cèl·lula	Acetil-P	0.001	cèl·lula
Acetil-CoA	0.001	cèl·lula	Acetat	1.0E-5	cèl·lula/medi
Ferredoxina oxidada	0.01	cèl·lula	Acetaldehid	0.002	cèl·lula
Ferredoxina reduïda	0.01	cèl·lula	Etanol	1.0E-5	cèl·lula/medi
NADP+	0.01	cèl·lula	Acetoacetyl-CoA	0.02	cèl·lula
NADPH	0.01	cèl·lula	3-Hidroxybutanoil-CoA	0.002	cèl·lula
H+	1.0E-7	cèl·lula/medi	Crotonil-CoA	0.002	cèl·lula
ATP	0.01	cèl·lula	Butiril-CoA	0.002	cèl·lula
ADP	0.01	cèl·lula	Butirat	1.0E-5	cèl·lula/medi
Pi	0.001	cèl·lula	Àcid acètic (HA)	1.0E-5	cèl·lula/medi
NAD+	0.01	cèl·lula	Àcid butíric (HBut)	1.0E-5	cèl·lula/medi

La xarxa de bioreacció proposada considera 36 espècies intracel·lulars (veure taula 11), de les quals només 10 es troben present tant en la cèl·lula com en el medi. Només 8 són metabòlits exclusius de la pròpia cèl·lula, els quals són: l'ADP, l'ATP, el fosfat, el NAD +, el NADH, el NADP +, el NADPH i les ferredoxines. Al suposar que aquests metabòlits no es transporten a través de la membrana, són considerats com a porcions conservades en condicions d'estats estacionari, juntament amb el CO<sub>2</sub>, el CoA i l'H<sub>2</sub>.

El conjunt d'ODEs obtingut del model es torba recollit en la següent taula:

Taula 12. Conjunt de totes les ODEs que formen el model

ODE (Ordinary Differential Equations)	ODE (Ordinary Differential Equations)
$d(\text{cell.CO}_2)/dt = 1/\text{cell} * (-R07157 - R00134 + \text{Flux\_CO}_2\text{\_entrada})$	$d(\text{cell.H}_2)/dt = 1/\text{cell} * (-R09508 + \text{Flux\_H}_2\text{\_in})$
$d(\text{CO})/dt = 1/\text{cell} * (R07157 - R08433 - R10243)$	$d([\text{Acetyl-P}])/dt = 1/\text{cell} * (R00230 - R00315)$
$d(\text{Formate})/dt = 1/\text{cell} * (R00134 - R00943)$	$d(\text{cell.Acetate})/dt = 1/\text{cell} * (R00315 - R01179 - \text{Acetate\_cell})$
$d(\text{Tetrahydrofolate})/dt = 1/\text{cell} * (-R00943 + R02289 + R10243)$	$d(\text{Acetaldehyde})/dt = 1/\text{cell} * (R00228 - R00746)$
$d([10\text{-formyltetrahydrofolate}])/dt = 1/\text{cell} * (R00943 - R01655)$	$d(\text{cell.Ethanol})/dt = 1/\text{cell} * (R00746 + \text{Flux\_Ethanol\_entrada})$
$d([5,10\text{-Methenyltetrahydrofolate}])/dt = 1/\text{cell} * (R01655 - R01220)$	$d([\text{Acetoacetyl-CoA}])/dt = 1/\text{cell} * (R00238 - R01975)$
$d([5,10\text{-Methylenetetrahydrofolate}])/dt = 1/\text{cell} * (R01220 - R07168)$	$d([3\text{-Hydroxybutanoyl-CoA}])/dt = 1/\text{cell} * (R01975 - R05595)$
$d([5\text{-Methyltetrahydrofolate}])/dt = 1/\text{cell} * (R07168 - R02289 - R10243)$	$d([\text{Crotonoyl-CoA}])/dt = 1/\text{cell} * (R05595 - R11675)$

$d([Acetyl-CoA])/dt = 1/cell*(R08433 + R10243 - R00230 - R00228 - 2*R00238 + R01179)$	$d([Butanoyl-CoA])/dt = 1/cell*(R11675 - R01179)$
$d(cell.[H+])/dt = 1/cell*(-R00134 - R01655 - R07168 - R02289 + R08433 + Water\_cell - R00228 - R00746 - R01975 + 2*R09508 - RNfn - Acetate\_cell - Butyrate\_cell + [Entrada\_H+] - [Sortida\_H+])$	$d([Butanoyl-CoA])/dt = 1/cell*(R11675 - R01179)$
$d([Co(I) \text{ corrinoid protein}])/dt = 1/cell*(-R02289 + R08433)$	$d(cell.Butyrate)/dt = 1/cell*(R01179 - Butyrate\_cell)$
$d([Methyl-Co(III) \text{ corrinoid protein}])/dt = 1/cell*(R02289 - R08433)$	$d(cell.HA)/dt = 1/cell*(Acetate\_cell + Flux\_HA\_entrada)$
$d(cell.Water)/dt = 1/cell*(R07157 + R01655 - Water\_cell + R05595)$	$d(cell.HBut)/dt = 1/cell*(Butyrate\_cell + Flux\_HBut\_entrada)$
$d(cell.[OH-])/dt = 1/cell*(Water\_cell)$	$d(Media.[H+])/dt = 1/Media*(Water\_Media - Acetate\_Media - Butyrate\_Media - [Entrada\_H+] + [Sortida\_H+])$
$d(Media.Butyrate)/dt = 1/Media*(-Butyrate\_Media)$	$d(Media.[OH-])/dt = 1/Media*(Water\_Media)$
$d(Media.HBut)/dt = 1/Media*(2*Butyrate\_Media - Flux\_HBut\_entrada)$	$d(Media.Water)/dt = 1/Media*(-Water\_Media)$
$d(Media.Ethanol)/dt = 1/Media*(-Flux\_Ethanol\_entrada)$	$d(Media.Acetate)/dt = 1/Media*(-Acetate\_Media)$
	$d(Media.HA)/dt = 1/Media*(Acetate\_Media - Flux\_HA\_entrada)$

En la taula 13 es troben recollides les velocitats de reacció de totes les vies del model, juntament amb els valors calculats de les respectives constants d'equilibri.

Taula 13. Velocitats de cada reacció i el valor de les seves constants de velocitat.

Identificador reacció	Flux (velocitat de reacció)	Constants de velocitat
R07157	$R07157 = k_f_{07157} \cdot cell.CO2 - k_r_{07157} \cdot CO$	$k_f = 0.9455$
		$k_r = 1$
R00134	$R00134 = k_f_{00134} \cdot cell.CO2 \cdot cell.[H+] - k_r_{00134} \cdot Formate$	$k_f = 0.9807$
		$k_r = 1$
R00943	$R00943 = k_f_{00943} \cdot Tetrahydrofolate \cdot Formate - k_r_{00943} \cdot [10\text{-formyltetrahydrofolate}]$	$k_f = 1.0439$
		$k_r = 1$
R01655	$R01655 = k_f_{01655} \cdot [10\text{-formyltetrahydrofolate}] \cdot cell.[H+] - k_r_{01655} \cdot [5,10\text{-Methenyltetrahydrofolate}]$	$k_f = 0.9318$
		$k_r = 1$
R01220	$R01220 = k_f_{01220} \cdot [5,10\text{-Methenyltetrahydrofolate}] - k_r_{01220} \cdot [5,10\text{-Methylenetetrahydrofolate}]$	$k_f = 1.0156$
		$k_r = 1$
R07168	$R07168 = k_f_{07168} \cdot cell.[H+] \cdot [5,10\text{-Methylenetetrahydrofolate}] - k_r_{07168} \cdot [5\text{-Methyltetrahydrofolate}]$	$k_f = 0.9925$
		$k_r = 1$

R02289	R02289 = $k_f_{02289} \cdot [5\text{-Methyltetrahydrofolate}] \cdot [\text{Co(I) corrinoid protein}] \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{02289} \cdot [\text{Methyl-Co(III) corrinoid protein}] \cdot \text{Tetrahydrofolate}$	$k_f = 1.0286$
		$k_r = 1$
R08433	R08433 = $k_f_{08433} \cdot \text{CO} \cdot \text{CoA} \cdot [\text{Methyl-Co(III) corrinoid protein}] - k_r_{08433} \cdot [\text{Acetyl-CoA}] \cdot [\text{Co(I) corrinoid protein}] \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+]$	$k_f = 0.9943$
		$k_r = 1$
R10243	R10243 = $k_f_{10243} \cdot [5\text{-Methyltetrahydrofolate}] \cdot \text{CO} - k_r_{10243} \cdot \text{Tetrahydrofolate} \cdot [\text{Acetyl-CoA}]$	$k_f = 1.0227$
		$k_r = 1$
Water	Water_cell = $k_f_{\text{Water}} \cdot \text{cell} \cdot \text{Water} - k_r_{\text{Water}} \cdot \text{cell} \cdot [\text{OH}^-] \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+]$	$k_f = 1.8182\text{e-}16$
		$k_r = 1$
R0230	R00230 = $k_f_{0230} \cdot [\text{Acetyl-CoA}] - k_r_{0230} \cdot [\text{Acetyl-P}] \cdot \text{CoA} \cdot \text{Pi}$	$k_f = 1.0124$
		$k_r = 1$
R0315	R00315 = $k_f_{0315} \cdot [\text{Acetyl-P}] - k_r \cdot \text{cell} \cdot \text{Acetate}$	$k_f = 0.9883$
		$k_r = 1$
R0228	R00228 = $k_f_{0228} \cdot [\text{Acetyl-CoA}] \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{0228} \cdot \text{Acetaldehyde}$	$k_f = 0.9783$
		$k_r = 1$
R0746	R00746 = $k_f_{0746} \cdot \text{Acetaldehyde} \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{0746} \cdot \text{cell} \cdot \text{Ethanol}$	$k_f = 0.9937$
		$k_r = 1$
R00238	R00238 = $k_f_{00238} \cdot [\text{Acetyl-CoA}]^2 - k_r_{00238} \cdot [\text{Acetoacetyl-CoA}]$	$k_f = 0.9881$
		$k_r = 1$
R01975	R01975 = $k_f_{01975} \cdot [\text{Acetoacetyl-CoA}] \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{01975} \cdot [3\text{-Hydroxybutanoyl-CoA}]$	$k_f = 0.9924$
		$k_r = 1$
R05595	R05595 = $k_f_{05595} \cdot [3\text{-Hydroxybutanoyl-CoA}] - k_r_{05595} \cdot [\text{Crotonoyl-CoA}]$	$k_f = 0.9964$
		$k_r = 1$
R11675	R11675 = $k_f_{11675} \cdot [\text{Crotonoyl-CoA}] - k_r_{11675} \cdot [\text{Butanoyl-CoA}]$	$k_f = 1.0642$
		$k_r = 1$
R01179	R01179 = $k_f_{01179} \cdot [\text{Butanoyl-CoA}] \cdot \text{cell} \cdot \text{Acetate} - k_r_{01179} \cdot [\text{Acetyl-CoA}] \cdot \text{cell} \cdot \text{Butyrate}$	$k_f = 0.9987$
		$k_r = 1$
R09508	R09508 = $k_f_{09508} \cdot \text{cell} \cdot \text{H}_2 \cdot [\text{NAD}^+]^{0.5} \cdot \text{Fer}_{\text{ox}}^{0.5} - k_r_{09508} \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+]^2 \cdot [\text{NADH}]^{0.5} \cdot \text{Fer}_{\text{red}}^{0.5}$	$k_f = 1.1089$
		$k_r = 1$
RNfn	RNfn = $k_f_{\text{RNfn}} \cdot [\text{NADP}^+]^2 \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+] \cdot [\text{NADH}] \cdot \text{Fer}_{\text{red}}^2 - k_r_{\text{RNfn}} \cdot [\text{NAD}^+] \cdot [\text{NADPH}]^2 \cdot \text{Fer}_{\text{ox}}^2$	$k_f = 0.9569$
		$k_r = 1$
Acetat	Acetat_cell = $k_f_{\text{Acetat}} \cdot \text{cell} \cdot \text{Acetat} \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{\text{Acetat}} \cdot \text{cell} \cdot \text{HA}$  Acetat_Media = $k_f_{\text{AcetatMedia}} \cdot \text{Media} \cdot \text{Acetat} \cdot \text{Media} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{\text{AcetatMedia}} \cdot \text{Media} \cdot \text{HA}$	$k_f = 1$
		$k_r = 1.7783\text{e-}05$
Butirat	Butirat_cell = $k_f_{\text{Butirat}} \cdot \text{cell} \cdot \text{Butirat} \cdot \text{cell} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{\text{Butirat}} \cdot \text{cell} \cdot \text{HBut}$  Butirat_Media = $k_f_{\text{ButiratMedia}} \cdot \text{Media} \cdot \text{Butirat} \cdot \text{Media} \cdot [\text{H}^+] - k_r_{\text{ButiratMedia}} \cdot \text{Media} \cdot \text{HBut}$	$k_f = 1$
		$k_r = 1.5136\text{e-}05$

De manera paral·lela, en la taula 14 es recullen les velocitats de difusió dels compostos que poden travessar la membrana (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, HA, HBut i l'etanol).

Taula 14. Recull de les velocitats de difusió.

Identificador reacció	Velocitat de difusió	Constant velocitat difusió
Difusió CO <sub>2</sub>	Flux_CO2_entrada = Kdifusio_CO2*(Media.CO2-cell.CO2)	KCO2 = 1
Difusió H <sub>2</sub>	Flux_H2_in = k_H2*(Media.H2-cell.H2)	kH2 = 1
Difusió à. acètic (HA)	Flux_HA_entrada = Kdifusio_HA*(Media.HA-cell.HA)	KHA = 1e+12
Difusió à. butíric (HBut)	Flux_HBut_entrada = Kdifusio_HBut*(Media.HBut-cell.HBut)	KHBut = 1e+12
Difusió Etanol	Flux_Ethanol_entrada = Kdifusio_Ethanol*(Media.Ethanol-cell.Ethanol)	KEthanol = 1e+12

En la següent taula es troben recollits la resta de paràmetres del model, el pH del exterior i l'interior de la cèl·lula i la relació de dimensions del bioreactor respecte la cèl·lula.

Taula 15. Altres paràmetres del model

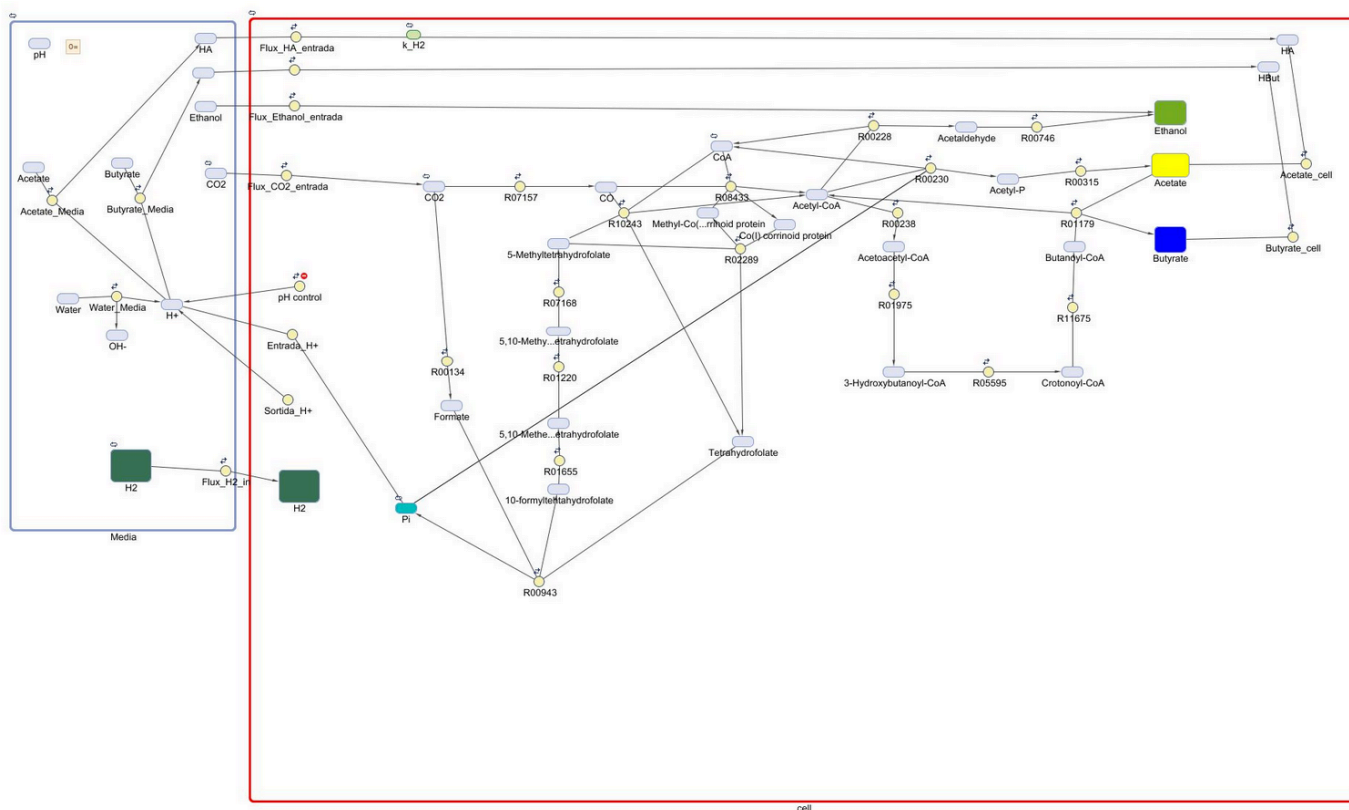
pH bioreactor (medi)	1E+06
pH cèl·lula	1E+06
Volum bioreactor (medi)	1000
Volum cèl·lula	1

Finalment, per tal de simular el complex Rnf, que permet la sortida de dos protons al medi, i el funcionament de l'ATPasa, que permet l'entrada de 4 protons a la cèl·lula, s'obtenen les reaccions següents:

Taula 16. Reaccions d'entrada i sortida de H<sup>+</sup>, juntament amb les seves velocitats de reacció

<b>ATPasa</b> (entrada de H <sup>+</sup> dins la cèl·lula)	Media.[H <sup>+</sup> ] + cell.ADP + cell.Pi -> cell.ATP + cell.[H <sup>+</sup> ]
	[Entrada_H+] = ADP*Pi*kph_in*(cell.pH-7.2)
<b>Complex Rnf</b> (sortida de H <sup>+</sup> fora la cèl·lula)	Cell.Fer_red + cell.[NAD <sup>+</sup> ] + cell.[H <sup>+</sup> ] -> cell.Fer_ox + cell.NADH + Media.[H <sup>+</sup> ]
	[Sortida_H+] = k_ph_out*(7.2-cell.pH)*Fer_red*[NAD <sup>+</sup> ]

En última instància, per tal de representar el model visualment, s'obté un diagrama esquemàtic on s'identifiquen els components i ambients principals que formen el model.



*Diagrama 1. Representació del model d'un microorganisme virtual*

## 5. Discussió

El principal requeriment biològic de qualsevol ésser viu, consisteix en la generació d'energia i la conservació d'aquesta per obtenir un creixement òptim. Així doncs, en aquest projecte s'estudia la fina línia que existeix entre la mínima generació d'energia, i la màxima conservació i aprofitament d'aquesta en dos microorganismes model: *Clostridium ljungdahlii* i *Clostridium kluyverii*. En tots dos microorganismes, l'únic mecanisme que els permet generar energia és la creació d'un gradient iònic a través de la membrana. Aquest procés es troba lligat a una reacció exergònica que resulta en la formació d'ATP a través d'una ATP sintasa lligada a la membrana.

Gran part dels microorganismes obtenen l'energia principalment de la fosforilació a nivell de substrat. En canvi, els acetògens no obtenen una producció neta d'ATP de la fosforilació, sinó que la obtenció i conservació d'energia es basa en l'establiment d'un mecanisme quimiosmòtic per mitjà de la translocació a través de membrana dels productes obtinguts durant la fosforilació (via WLP). Així doncs, és d'un gran interès centrar estudis en aquests tipus de microorganismes ja que la via WLP permet obtenir productes metabòlics d'alt nivell energètic, sense afectar a la supervivència del microorganisme.

En aquest projecte s'ha considerat que, per mitjà d'un estudi purament termodinàmic, es pot construir un model computacional que permet recrear el comportament d'un organisme acetògen virtual. D'aquesta manera, es simula el més acuradament possible l'activitat del bacteri en unes condicions fisiològiques favorables que permetin obtenir el màxim rendiment energètic i, consegüentment, el màxim de productes. Així doncs, durant la realització d'aquest treball s'han pogut diferenciar diversos factors que influeixen directament en el creixement bacterià, i consegüentment a l'obtenció de productes:

- Pressió parcial d'hidrogen: si una via es troba acoblada mecànicament a una reacció endergònica, com per exemple a la síntesi d'ATP o la reducció d'un donador d'electrons de baix potencial (com la ferredoxina), la pressió parcial  $H_2$  ha de ser prou elevada per poder proporcionar l'energia necessària per a aquesta reacció endergònica <sup>XI</sup>.
- Combinacions enzimàtiques: segons el tipus d'enzim que s'utilitzi en cada pas de la ruta, la velocitat de reacció es veurà afectada i, per tant, la concentració de productes i consegüentment, el creixement bacterià. Les diferents variacions enzimàtiques venen lligades al tipus de substrat utilitzat. Per exemple, *C. ljungdahlii* pot utilitzar el CO com a substrat i és per això que, segons l'ambient, utilitzarà un enzim o un altre per reduir el  $CO_2$  a format.
- Propietats de síntesi dels enzims: relacionat amb el punt anterior, segons les condicions inicials, els enzims tindran propietats diferents. La més destacada és la cinètica màxima, com per exemple, el cas de la format deshidrogenasa, la qual s'encarrega de convertir el  $CO_2$  a format, en condicions fisiològiques de pH de 7,5 i 55°C la seva activitat enzimàtica és de  $1110 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  <sup>XXIV</sup>.
- pH: segons el pH del medi extracel·lular i intracel·lular, el transport de metabòlits i la producció es pot veure afectada.
- Concentracions dels substrats i productes: tot i que en aquest model s'estableixin unes condicions inicials, cal tenir en compte que l'excés de producte pot afectar negativament a la via WLP.
- Disponibilitat del poder reductor: en aquest treball s'han considerat les concentracions de les parelles de poder reductor com a constants, per tal d'evitar que influeixin en l'obtenció dels productes i aquests pugin estar en constant generació fins a l'estabilització final del model.

### 5.1. Problemes del model

A continuació, es torben detallats diversos inconvenients que presenta el model amb possibles millores i propostes per estudis futurs.

**INCONVENIENT:** En aquest treball, s'assumeix que totes les reaccions es duen a terme a la mateixa velocitat, ja que s'ha igualat la constant d'equilibri a 1. Certament, tal i com s'ha explicat anteriorment, cada enzim té la seva pròpia cinètica però no tota es troba descrita bibliogràficament

en les mateixes condicions, i per aquest motiu s'ha utilitzat l'assumpció de la constant d'equilibri. No obstant cal remarcar que en aquest cas en particular s'està treballant en l'equilibri, fet que permet assegurar que el sistema sempre s'acabarà estabilitzant, independentment de les cinètiques dels enzims.

MILLORA: Així doncs, una millora podria ser una recerca detallada de les cinètiques de cada enzim que participa en el model per tal d'ajustar el sistema el més real possible, al treballar en condicions a l'equilibri.

INCONVENIENT: En aquest model s'assumeix el microorganisme virtual com a un únic conjunt (*sopa metabòlica*), és a dir, sense components i estructures intracel·lulars. De manera que, tal i com s'ha explicat anteriorment, la reducció de l'Acetil-CoA és un procés que ocorre al mitocondri i, per tant, s'haurien de tenir en compte les membranes mitocondrials.

MILLORA: Realitzar un model que tingui en compte els intercanvis entre el medi intramitocondrial i el citoplasma.

## 5.2. Aplicacions futures - Ètica i sostenibilitat

La possibilitat de potenciar rutes anaeròbiques per la generació de productes amb altes densitats energètiques obre portes al desenvolupament de biocombustibles i compostos d'un baix cost energètic. Tanmateix, també existeix la possibilitat de generar compostos químics amb cues d'hidrocarburs més llargues, com els àcids grassos volàtils, que permetran obtenir productes d'una major energia i menor solubilitat <sup>XI</sup>. És més, d'aquesta manera es poden reduir els costos dels processos productius i permetre l'ús d'aigües residuals. En part, aquestes millores en els processos de biorefineria podrien ajudar a reduir la dependència social de la indústria petroliera.

No obstant, el coneixement limitat de la bioquímica de les rutes metabòliques retarda la seva implementació industrial. Per tant, és interessant estudiar la viabilitat de les rutes catabòliques específiques d'interès per la indústria, tenint en compte les restriccions fisiològiques i cinètiques.

## 6. Conclusions

This paper presents a theoretical framework for metabolic study based on the quasi-thermodynamic equilibrium calculations to obtain a certain interest products from the reduction of CO<sub>2</sub>. The main conclusions of this work are as follows.

- (i) None of the reactions involved in the flow of carbon in the Wood- Ljungdahl path is directly responsible for the conservation of energy in the acetogenic organisms. And it is for this reason that a complementary chemosmotic system is necessary. The Rnf complex is proposed to couple the electron transfer from reduced ferredoxin (Fd<sup>2-</sup>) to NAD with the translocation of protons (H<sup>+</sup>) across the cytoplasmic membrane. The H<sup>+</sup> gradient is then used by a membrane-bound ATP synthase (ATPase) to generate ATP.



- (ii) The only metabolic point that allows the conservation of energy is the Rnf complex, present in both organisms. The final products obtained from the complex (such as the NADH) are used as electronic operators to combine both modules, the reduction of CO<sub>2</sub> and the production of energy.
- (iii) The total amount of energy obtained in the WL route in the form of ATP varies according to the enzymes involved in each model, since many enzymes that form the pathway in acetogenic bacteria are not yet known.
- (iv) Thus, *C.ljungdahlii* and *C.kluyveri* are considered as interesting organism to be used as a microbial production platform based on mixtures of carbon dioxide and hydrogen in order to obtain high-energy compounds as acetate, ethanol and butyrate.
- (v) There are certain parameters that directly affect the metabolic pathways and the results of the model like the partial hydrogen pressure, the enzymatic combinations, the different properties of enzyme synthesis, pH, the concentrations of substrates and products and the existence of reducing power.

## 7. Agraïments

Agraïments a la institució LEQUIA (UdG) que juntament amb altres professionals col·laboradors han fet possible la realització d'aquest Treball Final de Grau. Agrair també als Dr.Luis Bañeras i Dr. Sebastià Puig per el seu temps invertit en resoldre els dubtes biològics i termodinàmics que han anat sorgint en la redacció d'aquest treball. I finalment, agrair al tutor d'aquest projecte, el Dr. Jesús Colprim per iniciar-me en conceptes de termodinàmica i nous programes informàtics necessaris per el desenvolupament d'aquest treball.

## 8. Bibliografia

- I. Ragsdale, S.W. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate. Chem. Rev. 103, 2333-2346 (2003).
- II. Ljungdahl, L.G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 40, 415-450 (1986).
- III. Schuchmann, K. and Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12), pp.809-821.
- IV. Thauer R, Jungermann K, Decker K. 1977. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological reviews* Vol. 41:100-180.
- V. Buckel W, Thauer R. 2013. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/ Na<sup>+</sup> translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1827: 94-113.

- VI. Michaelis L, Schubert M, Smythe C. 1936. Potentiometric Study of the Flavins. Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research, New York:589-600. <http://www.jbc.org/content/116/2/587.full.pdf+html>
- VII. Maden B. 2000. Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C1 metabolism. *Biochemical Journal* 350:609-629.
- VIII. Berg I, Kockelkorn D, Ramos-Vera W, Say R, Zarzycki J, Hügler M, Alber B, Fuchs G. 2010. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology* 8:447-460. <http://www.nature.com/articles/nrmicro2365>
- IX. Martin W, Sousa F, Lane N. 2014. Energy at life's origin. *Science* 344:1092-1093.
- X. Tanner R, Miller L, Yang D. 1993. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43:232-236.
- XI. González-Cabaleiro R, Lema J, Rodríguez J, Kleerebezem R. 2013. Linking thermodynamics and kinetics to assess pathway reversibility in anaerobic bioprocesses. *Energy & Environmental Science* 6:3780.
- XII. Nagarajan H, Sahin M, Nogales J, Latif H, Lovley D, Ebrahim A, Zengler K. 2013. Characterizing acetogenic metabolism using a genome-scale metabolic reconstruction of *Clostridium ljungdahlii*. *Microbial Cell Factories* 12:118.
- XIII. *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528, complete genome - Nucleotide - NCBI. 2018. Ncbi.nlm.nih.gov. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_014328.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_014328.1)
- XIV. Barker H. 1937. The production of caproic and butyric acids by the methane fermentation of ethyl alcohol. *Archiv für Mikrobiologie* 8:415-421.
- XV. Schöberth S, Gottschalk G. 1969. Considerations on the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. *Archiv für Mikrobiologie* 65:318-328.
- XVI. Latendresse M. (2013). "Computing Gibbs Free Energy of Compounds and Reactions in MetaCyc."
- XVII. Latendresse M, Malerich J, Travers M, Karp P. 2012. Accurate Atom-Mapping Computation for Biochemical Reactions. *Journal of Chemical Information and Modeling* 52:2970-2982.
- XVIII. Equilibrí termodinàmic. (McInerney and Beaty, 1988).
- XIX. Konings W. 1985. Generation of metabolic energy by end-product efflux. *Trends in Biochemical Sciences* 10:317-319.
- XX. Konings W, Lolkema J, Poolman B. 1995. The generation of metabolic energy by solute transport. *Archives of Microbiology* 164:235-242.
- XXI. Tremblay P, Zhang T, Dar S, Leang C, Lovley D. 2012. The Rnf Complex of *Clostridium ljungdahlii* Is a Proton-Translocating Ferredoxin:NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase Essential for Autotrophic Growth. *mBio* 4:e00406-12-e00406-12.
- XXII. Huffer S, Clark M, Ning J, Blanch H, Clark D. 2011. Role of Alcohols in Growth, Lipid Composition, and Membrane Fluidity of Yeasts, Bacteria, and Archaea. *Applied and Environmental Microbiology* 77:6400-6408.
- XXIII. *Serjeant, E.P., Dempsey B.; Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IUPAC Chemical Data Series No. 23, 1979. New York, New York: Pergamon Press, Inc., p. 989*

- XXIV. Yamamoto I, Saiki T, Liu S, Ljungdahl L. 1983. Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. J Biol Chem 258:1826-32. s